

胶原/透明质酸膜与明胶海绵支架材料力学及组织相容性的比较[☆]

肖荣冬¹, 翁国星²

Comparison of material mechanics and histocompatibility between collagen/hyaluronic acid membrane and gelatin sponge scaffold

Xiao Rong-dong¹, Weng Guo-xing²

Abstract

BACKGROUND: Our previous studies have confirmed that collagen/hyaluronic acid membrane has good mechanical properties and histocompatibility.

OBJECTIVE: To explore the biological properties of collagen/hyaluronic acid membrane and gelatin sponge scaffold.

METHODS: The collagen/hyaluronic acid membrane was constructed by compound cross linking method. The mechanical property of the collagen/hyaluronic acid membrane and gelatin sponge scaffold was detected. The scaffold materials were implanted subcutaneously in rabbits; the *in vivo* degradation and mechanical properties were evaluated at 2, 4, 6, 8 and 12 weeks after implantation.

RESULTS AND CONCLUSION: Collagen/hyaluronic acid membrane was constructed successfully. Collagen/hyaluronic acid membrane had a better toughness and tensile strength while the mechanical property of gelatin sponge was not ideal. The *in vivo* degradation of the two materials was compatible with the tissue reactions of biomaterials. Complete degradation of the collagen/hyaluronic acid membrane could be done within 12 weeks, while the gelatin sponge within 6 weeks. The adhesion rate between the collagen/hyaluronic acid membrane and smooth muscle cells was high; the cell proliferation and the metabolic status were good. The adhesion rate and proliferation rate of the gelatin sponge was relatively low. These findings indicate that gelatin sponge has better biological properties.

Xiao RD, Weng GX. Comparison of material mechanics and histocompatibility between collagen/hyaluronic acid membrane and gelatin sponge scaffold. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(25): 4637-4643. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 课题组前期实验证明胶原/透明质酸膜具有良好的力学性能和组织相容性。

目的: 观察复合材料胶原/透明质酸膜及明胶海绵的生物力学性能。

方法: 应用材料复合交联的实验方法构建胶原/透明质酸膜并测定胶原/透明质酸膜、明胶海绵支架的力学性能。将支架材料种植于兔皮下, 按照 2, 4, 6, 8, 12 周不同时间点评价材料在体内的降解情况和组织相容性。

结果与结论: ①成功制备了胶原/透明质酸膜。②胶原/透明质酸膜具有较好的韧性和抗张强度, 明胶海绵的力学性能不够理想。③两种材料在体内的降解均符合生物材料的组织反应过程, 胶原/透明质酸膜在体内 12 周可完全降解, 明胶海绵约 6 周完全降解。④胶原/透明质酸膜与平滑肌细胞的黏附率高, 细胞的增殖和代谢状况较好, 而明胶海绵的细胞黏附率和增殖率相对较低。说明胶原/透明质酸膜具有较好的生物学性能。

关键词: 胶原/透明质酸膜; 明胶海绵; 生物学性能; 组织相容性; 降解; 增殖; 生物材料

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.25.016

肖荣冬, 翁国星. 胶原/透明质酸膜与明胶海绵支架材料力学及组织相容性的比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(25):4637-4643. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

人体对材料的降解过程非常复杂, 包括特

异性酶降解, 非特异性酶降解, 水解及溶解等过程。体外构建组织工程材料, 种植的细胞仅仅是实质细胞, 尚不涉及到材料的降解, 植入体内后, 将面临各种生物降解反应, 生物材料

¹Department of Cardiac Surgery, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China; ²Department of Cardiovascular Surgery, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Xiao Rong-dong[☆], Doctor, Associate chief physician, Department of Cardiac Surgery, Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China
xrddoctor@yahoo.com.cn

Supported by: the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. 2010J01131*

Received: 2011-11-05
Accepted: 2011-11-26

¹ 福建医科大学省立临床学院心外科, 福建省福州市 350001; ² 福建省立医院心血管外科, 福建省福州市 350001

肖荣冬[☆], 男, 1973 年生, 福建省武平县人, 汉族, 2006 年福建医科大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事组织工程血管研究。
xrddoctor@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225(2012)25-04637-07

收稿日期: 2011-11-05
修回日期: 2011-11-26
(20110915009/D · LX)

要求具有一定的强度, 在一定的时间内能够维持形态和结构稳定。而作为组织工程血管的支架材料, 植入体内后不仅要面临生物降解, 同时须耐受血流的冲击, 因此对材料的力学强度要求更高。

构建组织工程器官, 选用良好的可降解生物材料作为支架, 引导工程化组织结构和功能的重建, 植入体内后逐渐以自体组织替代工程组织, 这是构建组织工程器官的一个关键的步骤。理论上合适的生物支架材料应具有如下特点^[1]: ①良好的生物可降解性。②较好的生物相容性。③不引发机体的免疫排斥反应。④孔隙率至少为90%, 提供高表面便于细胞与生物材料相互作用, 有足够的空间供细胞外基质再生, 细胞外支架结构体外培养时, 扩散率最小。⑤由于植入材料有诱发炎症的长期潜伏的危险, 作为组织再生的支架应能被吸收, 且其吸收率应和新生组织形成相匹配。而作为组织工程器官支架, 除了考虑材料自身的特性, 还应当注意其物理特性、化学特性和力学特性。支架的物理特性主要包括三维空间的形态, 孔径大小孔隙等, 化学特性主要包括材料吸水性, 材料的降解性和表面电荷等; 力学特性主要指材料的弹性, 抗张强度和断裂伸长率等^[2]。

本实验应用天然生物材料制备组织工程复合支架材料, 应用胶原和透明质酸制备胶原/透明质酸膜, 并对所制备的胶原/透明质酸膜和明胶海绵进行材料力学性能和生物学性能及细胞黏附和增殖力进行测定, 并与明胶海绵进行对比。

1 材料和方法

设计: 材料学观察。

时间及地点: 于2009/2010-11福建医科大学省立临床学院心外科重点实验室及福建医科大学附属第一医院高血压研究室完成。

材料:

主要试剂:

试剂	来源
胶原/透明质酸膜、明胶海绵	Pfizer corporation USA
胶原溶胀液, 医用级透明质酸钠, 0.3% 丙二酸, 高碘酸钠, 亚硫酸氢钠	中国医学科学院生物工程研究所
戊二醛(分析纯)、硼氢化钠(分析纯)、氢氧化钠(分析纯)、乙醇(分析纯)	上海试剂公司
I 型胶原酶	Sigma
胰蛋白酶、溶菌酶、去离子水	Gibco 公司

实验动物: 健康新西兰大白兔16只, 雌雄不拘, 体重2.0~2.5 kg, 实验动物购于福建医科大学, 实验动

物许可证2: SYXK(闽)-2008-0001。实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理要求。

主要仪器:

仪器	来源
FALCO 细菌培养用培养皿	FALCON Franklin Lakes, USA
万能实验机	Testometric, M500-25KN
接触角测量仪	承德实验仪器厂
LZG-3 型冷冻真空干燥机	chaist, Alpha 2-4
普通光学显微镜	德国 LEICA 公司
精密天平(BS110S0)	德国 SARTORIUS
JSM-840 扫描电镜	中国科学院科学仪器
低温冰箱	SANYO
超净工作台(BCM-1000 型)	苏净集团
KS400 图像分析系统(Ver2.2)	德国 ZEISS 公司

方法:

胶原/透明质酸膜的制备: 采用中国生物工程研究所提取制备胶原溶胀液, 主要是 I 型胶原, 用0.3%的丙二酸稀释至 0.6%, 转入合适的容器中, -35 °C 预冻2 h, 后进行真空冷冻干燥50 h。取出压平整, 使成相对致密层。医用级透明质酸钠溶解于水中, 用高碘酸钠溶液(含高氯酸钠)进行氧化处理, 反应结束后, 缓慢滴加亚硫酸氢钠溶液还原未反应的残余氧化剂, 根据颜色变化确定加入量, 至颜色为无色为止, 大量对水透析4 °C 72 h, 每日更换透析用水4次, 预冻, 冻干待用。按合适的比例分别称取胶原溶胀液和经处理的透明质酸钠, 分别稀释和溶解, 透明质酸钠用量相对胶原干质量含量的15%(质量比), 用0.3%丙二酸或水溶解于成溶液, 均匀分散的胶原稀释液中缓慢加入透明质酸钠溶液, 边加边低速搅拌使二者混匀, 预冻适当时间, 将已制备好的胶原致密层平整地覆于其上, 继续冷冻并进行冻干处理, 成为双侧致密程度不同的复合材料。制得的成型复合材料用甲醛溶液交联120 min, 交联后用蒸馏水充分洗涤10~15次并浸泡过夜至中性。然后再将其置于容器中预冷冻, 后冷冻干燥方法冻干。从冻干机中取出后再次将膜压平整成为最终制品。

明胶海绵支架: 购于美国Pfizer公司, 应用红外光谱对明胶海绵进行检测和化学分析, 分析结果表明其由 II 型明胶分子交联而成, 未添加其他聚合物。

光镜观察: 将上述两种材料分别经体积分数10%中性甲醛固定后, 石蜡包埋, 切片后苏木精-伊红染色常规染色, 对材料进行二维平面观察。

扫描电镜观察: 将真空干燥三维骨架材料直接喷金后, 观察材料的立体结构。利用KS400图像分析系统测量材料三维孔径。

力学性能测定: 主要衡量指标为材料的韧性指标和抗张强度, 用万能测试机测定样品的力学性能。

材料韧性指标的测定: 样品均为4 cm×1 cm的条状, 用千分尺测量膜的厚度为1 mm, 室温下用拉力试验机进行拉力分析, 每组样品5个, 实验结果为3个样品的统计平均。测定断裂应力和杨氏模量, 由此得出材料的断裂应变。应用万能测试机测定单位截面积所承受的最大应力得出材料的抗张强度, 每组样品5个。

体外降解实验: ①将胶原/透明质酸膜, 明胶海绵分别裁剪成5 mm×5 mm×1 mm支架各24块备用。②分别配置去离子水, 0.1% I型胶原蛋白酶液(pH 7.0), 1%溶菌酶液(pH 7.0)为溶解液。③室温下, 取6孔板培养板数块, 每孔中放入一块材料, 分别加入去离子水, 胶原蛋白酶, 溶菌酶各5 mL。材料依次称量, 记为 m_0 , 分别在1, 2, 4, 12 h取出材料($n=6$), 置于0.45 μ 滤膜上, 其下置多层滤纸, 静置1 min。称量并分别记录为 m_1 , m_2 , m_3 , 和 m_4 。④材料质量丢失率计算公式: 丢失率 $=(m_0-m_x)/m_0 \times 100\%$, 其中 m_x 代表各时段材料质量结果。

体内降解实验和材料生物相容性实验: 采用兔皮下包埋实验, 具体方法如下: ①将3种材料分别裁剪成1.0 cm×1.0 cm×0.1 cm大小各30块, γ 射线照射消毒备用。②随机选取15只新西兰白兔摸球法分成5组, 分为2, 4, 6, 8, 12周观察组。③新西兰白兔以3%戊巴比妥钠3 mg/kg耳缘静脉推注麻醉, 取俯卧位固定于手术台上, 背部两侧备皮, 消毒、铺巾, 在兔背腰段脊柱两侧切开背部皮肤, 钝性分离皮下组织, 沿脊柱两侧各形成两个腔隙, 将胶原/透明质酸膜, 明胶海绵材料分别植入各腔隙(其中, 靠头侧腔隙植入胶原/透明质酸膜, 靠尾侧腔隙植入明胶海绵), 缝合皮下组织, 皮肤, 无压力包扎, 饲养。术后3 d给予青霉素 40×10^4 U肌注抗感染。于每个观察期末, 沿原切口切开皮肤, 游离皮下组织, 切取残余的种植材料, 生理盐水冲洗, 以体积分数10%中性甲醛保存, 石蜡包埋, 切片, 行苏木精-伊红染色, 观察材料降解情况及细胞浸润情况。④缝合皮下组织, 皮肤, 无压力包扎, 连续给予青霉素 40×10^4 U肌注3 d, 动物房饲养以备后面实验用。

平滑肌细胞的获得: 取剩余1只白兔主动脉, 采取组织贴块法培养平滑肌细胞^[3]。应用WST-1法测定平滑肌细胞与材料的黏附率, 应用WST-1测定平滑肌细胞在材料上的增殖力。

平滑肌细胞在生物材料上黏附率的测定: WST-1法测定平滑肌细胞在生物材料上的黏附率: 将传至第3代的平滑肌细胞按 1×10^{10} L⁻¹浓度接种到96孔板上, 每孔

100 μ L, 加入新鲜胎牛血清, 接种细胞后, 于1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h各取出一块培养板, 先小心吸去孔内培养液, 重新沿侧壁缓缓加入含体积分数10%新生胎牛血清的M199培养液200 μ L, 然后加入WST-1(5 mg/L)20 μ L, 继续培养4~6 h, 然后小心吸出孔内液体, 每孔加入150 μ L二甲基亚砜, 振荡10 min, 用490 nm波长, 在ELISA仪上测定各孔底A值。

平滑肌细胞在生物材料上的成活和增殖力的测定: 将传至第3代的平滑肌细胞按 1×10^{10} L⁻¹浓度接种到96孔板上, 每孔100 μ L, 加入新鲜胎牛血清, 接种细胞后, 于1, 3, 5, 7 d各取出一块培养板, 先小心吸去孔内培养液, 重新沿侧壁缓缓加入含体积分数10%新生胎牛血清的M199培养液200 μ L, 然后加入WST-1(5 g/L)20 μ L, 继续培养4~6 h, 然后小心吸出孔内液体, 每孔加入150 μ L二甲基亚砜, 振荡10 min, 用490 nm波长, 在ELISA仪上测定各孔底A值。

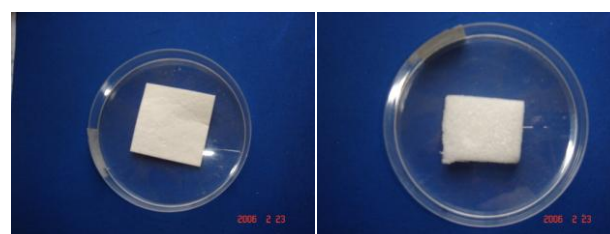
主要观察指标: 观察平滑肌细胞的黏附率和增殖力及生物降解率。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 16.0统计软件计算, 检查数据用 $\bar{x} \pm s$, 组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 纳入15只新西兰白兔随机摸球法分成5组, 分为2, 4, 6, 8, 12周进行观察, 实验过程中无脱失。

2.2 各种生物支架材料大体观 胶原/透明质酸膜外观成白色, 表面有细孔状结构, 质地柔软, 见图1a, 明胶海绵外观为白色, 表面有细孔状结构, 较柔软, 见图1b。



a: Collagen/hyaluronic acid membrane

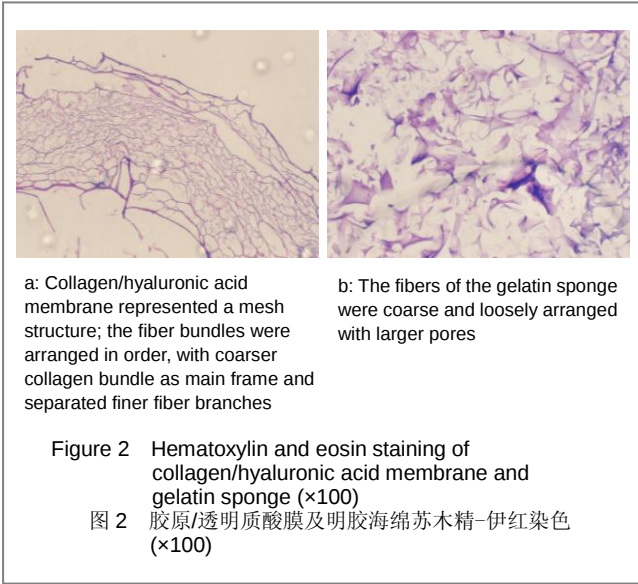
b: Gelatin sponge

Figure 1 Surface color of the collagen/hyaluronic acid membrane and gelatin sponge was white

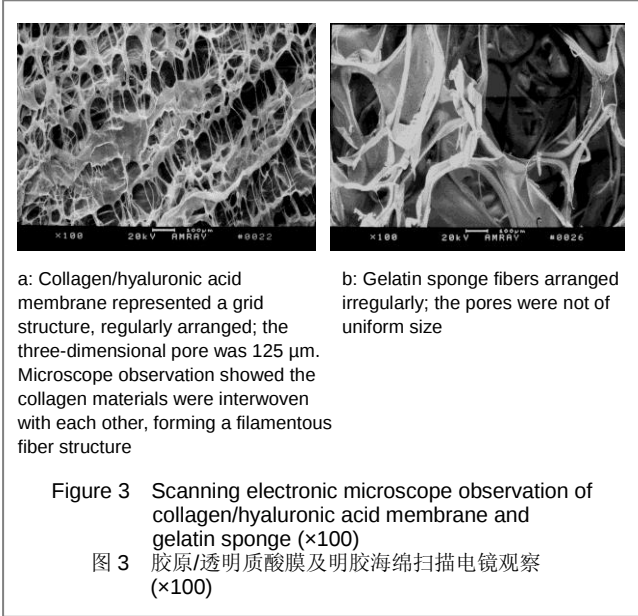
图1 胶原/透明质酸膜和明胶海绵外观均呈白色

2.3 光学显微镜观察 苏木精-伊红染色下显示胶原/透明质酸膜呈网孔状结构, 材料为胶原质地, 表现为红色胶原染色, 纤维束排列规则, 以较为粗大的胶原纤维

束为主框架, 随走行分出更多细的纤维分支, 在二维平面成分隔状, 腔隙间可见互通, 见图2a; 明胶海绵苏木精-伊红染色显示明胶海绵呈网格状结构, 纤维较粗大, 排列较松散, 较疏松, 孔隙较大, 见图2b。



2.4 扫描电镜观察 胶原/透明质酸膜呈网格状结构, 排列规则, 其三维孔径测量125 μm, 镜下观察胶原材料表现为相互交织成网的细丝状三维结构, 呈空洞状结构, 各空洞间存在大小不等的交通孔相连, 见图3a; 明胶海绵为网格状结构, 排列较不规则, 孔隙大小不一, 最大孔隙达170 μm, 见图3b。



2.5 生物材料力学性能测定结果 干态下胶原/透明质酸膜的韧性和抗张强度均好于明胶海绵, 湿态下各种材料的力学性能均有不同程度的下降, 但胶原/透明质酸膜的韧性和抗张强度仍好于明胶海绵, 见表1, 2。

表1 干态下材料力学性能测定结果
Table 1 Mechanical property of the materials under dry state (x±s, n=5)

Item	Collagen/hyaluronic acid membrane	Gelatin sponge
Breaking elongation rate (%)	165.1±5.7 ^a	95.0±3.7
Tensile strength (Pa)	5×10 ³ ±100.2 ^a	1.5×10 ³ ±111.3

^aP < 0.05, vs. gelatin sponge

表2 湿态下材料力学性能测定
Table 2 Mechanical property of the materials under hygrometric state (x±s, n=5)

Item	Collagen/hyaluronic acid membrane	Gelatin sponge
Breaking elongation rate (%)	135±4.5 ^a	50±2.3
Tensile strength (Pa)	3.5×10 ³ ±120.4 ^a	500±41.1

^aP < 0.05, vs. gelatin sponge

2.6 体外降解实验结果 胶原/透明质酸膜, 明胶海绵在不同生物酶体外降解的质量丢失率结果不同, 胶原/透明质酸膜胶原酶降解最多, 去离子水降解最少, 而明胶海绵在去离子水中很容易得到水相而降解, 见表3。

表3 生物材料质量丢失率
Table 3 Quality loss rate of the biomaterials (x±s, n=6, %)

Item	Collagen/hyaluronic acid membrane	Gelatin sponge
Collagenase		
1 h	31.8±1.1	1.5±0.3
2 h	45.8±2.0	2.5±0.4
4 h	54.7±1.5	3.8±0.2
12 h	75.8±1.4	6.5±0.3
Muramidase		
1 h	1.8±0.2	2.4±0.2
2 h	4.5±1.2	5.0±0.4
4 h	8.6±0.5	6.5±0.3
12 h	8.9±0.4	6.7±0.4
Deionized water		
1 h	1.5±0.2	33.6±1.1
2 h	3.6±0.4	41.5±1.4
4 h	6.5±0.3	48.2±1.3
12 h	7.6±0.4	57.6±1.7

Lose rate= (m₀-m_x)/m₀×100%, m_x represents material quality at different time points

2.7 体内降解实验 两种材料在体内均符合生物材料体内降解反应的一般过程, 无明显炎症反应, 组织相容性满意。

大体观察: 全部实验动物存活, 手术切口愈合良好, 未见急性炎症和局部积液、积脓改变。

胶原/透明质酸膜: 2周时局部已形成纤维组织包裹, 包裹块外形无明显区别, 呈球形, 与周围组织无粘连, 剖开包裹组织, 见胶原/透明质酸膜仍成形, 与组织易分

离, 但质地较软; 4周时见组织块包裹体积较2周时小, 包裹块呈透明样, 透过组织块依稀可见生物材料, 胶原/透明质酸膜仍较完整, 局部出现软化现象, 6周时材料仍保持基本的结构存在, 但已出现材料液化, 质地不清的现象; 8周时材料的基本结构破坏, 基本降解; 12周时材料包裹块也消失, 无肉眼可见的剩余组织存在。

明胶海绵: 2周时局部已形成纤维组织包裹, 包裹块外形无明显区别, 呈球形, 与周围组织无粘连, 剖开包裹组织, 明胶海绵已出现材料软化, 结构不清的形态; 4周时见组织块包裹体积较2周时小, 包裹块呈透明样, 透过组织块依稀可见生物材料, 材料已基本消失, 接近降解; 6周时可见明胶海绵包裹块已消失, 剖开已无肉眼可见的明胶海绵材料存在。

光学显微镜观察: 苏木精-伊红染色观察, 全部标本均未见变性, 坏死及局部积脓现象。

胶原/透明质酸膜: 2周时种植材料结构仍清晰, 包被组织疏松, 周围可以见到大量浸润细胞, 主要包括中心粒细胞, 单核细胞等, 材料中心部位少见浸润细胞, 见图4a; 4周时大体情况同上, 材料仍结构清晰, 有更多的细胞进入材料中央部位, 以单核细胞为主, 见图4b; 6周时胶原材料已出现结构不清, 浸润细胞完全进入材料与之夹杂在一起, 出现新生的组织纤维与材料混杂, 浸润细胞逐渐减少, 见图4c; 8周时: 材料已基本降解, 新生的组织纤维增多, 浸润的细胞更少, 未出现炎症反应, 见图4d; 12周: 种植材料已降解, 代以新生的胶原纤维, 排列较规则, 内有较多的新生血管, 见图4e。

明胶海绵: 2周时: 明胶海绵材料结构模糊不清, 以单核细胞淋巴细胞浸润, 可见新生胶原、毛细血管等新生组织, 可见残余的明胶海绵, 见图5a; 4周时: 见明胶海绵已被基本降解, 代以不完整的新生纤维, 较多的细胞浸润, 见图5b; 6周时: 浸润的细胞减少, 材料降解区与纤维组织分界不清, 材料降解区被宿主新生胶原纤维代替, 排列规则, 未见组织坏死区域, 见图5c。

2.8 WST-1测定平滑肌细胞黏附率及增殖与代谢活力 随培养时间延长, 各组细胞数均有所增加, 胶原/透明质酸膜组与单纯细胞组接近, 但其黏附率最高, 明胶海绵组最低, 结果表明胶原/透明质酸膜最适合血管平滑肌细胞的附着和生长, 见表4。WST-1法测定平滑肌细胞在材料上的增殖与代谢活力表明, 随培养时间延长, 各组细胞数均有所增加, 胶原/透明质酸膜的A值较胶海绵组高($P < 0.05$), 与单纯细胞组接近, 明胶海绵的细胞增殖最低, 胶原/透明质酸膜增殖最好, 见表5。

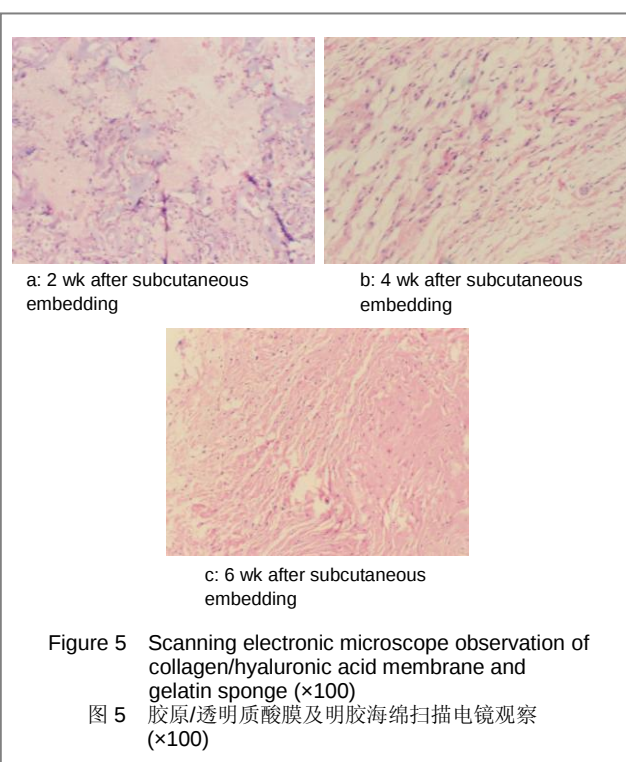
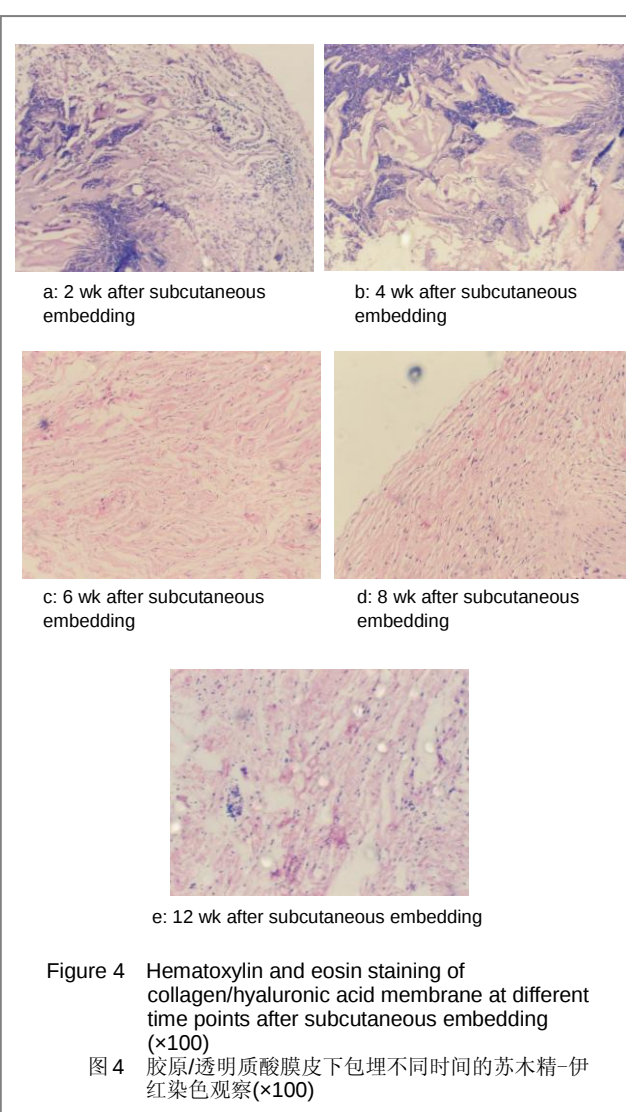


表 4 平滑肌细胞与各种生物材料黏附率的测定
Table 4 Adhesion rate between smooth muscle cells and different biomaterials ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, A)

Inoculation time	Collagen/hyaluronic acid membraneg group	Gelatin sponge group	Simple cell group
1 h	0.410±0.018 ^a	0.133±0.010 ^b	0.417±0.020
2 h	0.425±0.020 ^a	0.221±0.022 ^b	0.455±0.021
4 h	0.455±0.014 ^a	0.236±0.012 ^b	0.459±0.015
6 h	0.466±0.030 ^a	0.240±0.023 ^b	0.470±0.032
8 h	0.469±0.040 ^a	0.250±0.028 ^b	0.473±0.044
12 h	0.473±0.033 ^a	0.260±0.033 ^b	0.477±0.035
24 h	0.475±0.034 ^a	0.271±0.023 ^b	0.478±0.044

^a $P < 0.05$, vs. gelatin sponge group; ^b $P < 0.05$, vs. simple cell group

表 5 平滑肌细胞在材料上的增殖与代谢活力
Table 5 Proliferation and metabolic activity of smooth muscle cells on different materials ($\bar{x} \pm s$, $n=8$, A)

Inoculation time	Collagen/hyaluronic acid membraneg group	Gelatin sponge group	Simple cell group
1 d	0.321±0.012 ^a	0.133±0.010 ^b	0.355±0.020
3 d	0.410±0.021 ^a	0.221±0.022 ^b	0.458±0.015
5 d	0.501±0.011 ^a	0.256±0.015 ^b	0.560±0.012
7 d	0.699±0.013 ^a	0.305±0.011 ^b	0.750±0.015

^a $P < 0.05$, vs. gelatin sponge group; ^b $P < 0.05$, vs. simple cell group

3 讨论

作为组织工程用的生物材料要求它的力学强度, 刚性和黏弹性与目标组织相适应, 而材料的抗张强度和断裂伸长率是主要的力学指标, 抗张强度为一定单位面积下材料所能承受的最大压力, 而断裂伸长率即断裂应变可以反映材料的韧性强度, 通过万能测试机可以分别测定抗张强度, 断裂应变可以由测得的断裂应力和杨氏模量计算出来, 从而反应材料的韧性指标^[4]。实验结果表明, 胶原/透明质酸膜的干态和湿态抗张强度均高于明胶海绵, 而在湿态下材料的抗张强度均有所下降, 胶原/透明质酸膜的断裂伸长率也明显, 明胶海绵由于其吸水性较强, 在水相中很快转变成凝胶状, 力学强度大幅度降低, 而胶原/透明质酸膜在湿态下的变化不是那么明显。这一结果表明实验制备的胶原/透明质酸膜, 而由单一的明胶分子交联而成的明胶海绵在干态和湿态下其抗张强度和断裂伸长率均较差。文献资料表明可利用化学和物理的方法对生物材料进行交联, 从而增加生物材料的力学性能^[5]。本实验采用胶原和透明质酸这两种天然生物材料按一定的比例复合, 并采用冷冻, 戊二醛等化学和物理交联的方法制备了胶原/透明质酸膜; 虽然生物材料在体外测定的力学指标结果显示这些材料具有

一定的抗张强度和韧性, 但是用于构建组织工程血管的生物支架要求具有更高的力学强度, 从而承受血管内血流对材料结构的不断冲击, 因此, 能否承受体内的血管内压力的冲击, 是在下一步实验中研究的课题, 如何进一步改善支架材料的力学性能是一个极为重要的课题, 也是未来的研究方向之一。

生物降解的定义是指由特定的生物活动引起的材料的逐渐破坏^[6-7]。实验分别应用胶原酶, 溶菌酶和去离子水进行材料的体外降解实验, 结果表明, 胶原/透明质酸膜为非水溶性生物材料, 主要的降解途径为酶解, 而明胶海绵由于是由明胶分子聚合而成, 而明胶本身是水溶性, 因而在水相中易降解。胶原/透明质酸膜的成分胶原蛋白体内降解主要通过胶原酶及部分电性蛋白酶的作用^[8-9]。本实验选用 I 型胶原酶, 溶菌酶, 去离子水对支架材料进行降解测试, 结果表明在去离子水中胶原/透明质酸膜, 明胶/壳聚糖膜均无降解, 甚至材料湿重略有增加, 说明它们在水中难以降解, 胶原/透明质酸膜在胶原酶中降解效果最明显, 由于胶原基生物材料的成分为胶原蛋白, 因而在胶原酶中的降解较明显。

材料在体内的降解过程非常复杂, 包括特异性酶降解, 非特异性酶降解, 水解及溶解^[10-11]。皮下包埋实验是将生物材料埋入动物皮下, 以观察材料在组织体内的反应情况, 可以评价材料在体内的降解性和生物相容性^[12-13]。结果表明: 胶原/透明质酸膜和明胶海绵在兔体内的反应符合一般生物相容性材料的组织反应过程。早期以中性粒细胞浸润为主, 可伴有多核巨细胞, 纤维膜厚, 疏松, 中期炎性细胞少, 淋巴细胞增多, 多核巨细胞少见, 纤维膜变致密, 晚期炎性细胞少, 以淋巴细胞为主, 未见多核巨细胞, 纤维膜进一步变薄, 致密, 成纤维细胞多转化为纤维细胞。胶原/透明质酸膜在8周左右大部分已被吸收, 12周左右已完全吸收, 明胶海绵在6周时已基本吸收, 材料成泡沫状。

无论是天然生物材料还是人工合成的生物可降解材料, 尚未有一种材料可以在物理特性、化学特性和力学性能等各方面完全达到组织工程血管的要求^[14-15]。实验应用多种材料复合, 交联的方法, 并选择了在组织工程领域中应用较广泛的天然生物材料胶原, 透明质酸进行材料之间的复合制备出胶原/透明质酸膜并进行了一些研究。组织工程的迅猛发展, 对血管支架材料的要求越来越迫切, 如何进一步完善支架材料的各项性能, 是组织工程研究中的一个重要的问题。

致谢: 感谢厦门大学医学院生物工程系的帮助, 感谢福建医科大学附属第一医院高血压研究室在实验中

的支持与帮助。

4 参考文献

- [1] Kothapalli CR, Ramamurthi A. Benefits of concurrent delivery of hyaluronan and IGF-1 cues to regeneration of crosslinked elastin matrices by adult rat vascular cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(2-3):106-116.
- [2] Kothapalli CR, Ramamurthi A. Copper nanoparticle cues for biomimetic cellular assembly of crosslinked elastin fibers. *Acta Biomater.* 2009;5(2):541-553.
- [3] Will J, Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2011 Nov 16.
- [4] Ragety GR, Griffon DJ, Lee HB, et al. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomater.* 2010;6(4):1430-1436.
- [5] Teixeira S, Ferraz MP, Monteiro FJ. Biocompatibility of highly macroporous ceramic scaffolds: cell adhesion and morphology studies. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(2): 855-859.
- [6] McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissue-engineered vascular graft: a multicentre cohort study. *Lancet.* 2009;373(9673): 1440-1446.
- [7] Roshan-Ghias A, Terrier A, Bourban PE, et al. In vivo cyclic loading as a potent stimulatory signal for bone formation inside tissue engineering scaffold. *Eur Cell Mater.* 2010; 19:41-49.
- [8] McClary KB, Ugarova T, Grainger DW. Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self-assembled monolayer films of alkylthiolates on gold. *J Biomed Mater Res.* 2000;50(3):428-439.
- [9] Shigemasa Y, Saito K, Sashiwa H, et al. Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int J Biol Macromol.* 1994;16(1):43-49.
- [10] Maria VP, Sandro P. Standards on biomaterials, in Rolando Barbucci, integrated biomaterials science. New York: Kluwer Academic/Plenum publisher, 2002.
- [11] Hao HP. Beijing: Beijing: China standard press. 2000. 郝和平. 医疗器械生物学评价标准实施指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [12] Mandoli C, Mecheri B, Forte G, et al. Thick soft tissue reconstruction on highly perfusive biodegradable scaffolds. *Macromol Biosci.* 2010;11;10(2):127-138.
- [13] Zhang X, Wang X, Keshav V, et al. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials.* 2009;30(19):3213-3223.
- [14] Prasad CK, Krishnan LK. Regulation of endothelial cell phenotype by biomimetic matrix coated on biomaterials for cardiovascular tissue engineering. *Acta Biomater.* 2008;4(1): 182-191.
- [15] Deutsch M, Meinhart J, Zilla P, et al. Long-term experience in autologous in vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts. *J Vasc Surg.* 2009;49(2):352-362.

来自本文课题的更多信息—

基金声明: 福建省自然科学基金资助项目 (2010J01131)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计并实施, 资料收集, 成文, 第二作者审核。

利益要求: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

本文创新性: 组织工程支架材料的选择是组织工程研究的重点内容和必备条件之一, 本文应用材料复合的方法制备出复合材料胶原/透明质酸膜并对其力学性能及生物相容性及细胞黏附和增殖等进行了全方位的研究, 对组织工程血管材料的选择进行了系统的研究。